



8º CONGRESO FORESTAL ESPAÑOL

La **Ciencia forestal** y su contribución a
los **Objetivos de Desarrollo Sostenible**



8CFE

Edita: Sociedad Española de Ciencias Forestales

Cataluña | Catalunya - 27 junio | juny - 1 julio | juliol 2022

ISBN 978-84-941695-6-4

© Sociedad Española de Ciencias Forestales

Organiza



La influencia de las comunidades fúngicas en las plantaciones de trufa negra (*Tuber melanosporum*)

OLIACH, D.¹, CASTAÑO, C.², COLINAS, C^{1,3}, BONET, J.A.^{2,4}, MARTÍNEZ DE ARAGÓN, J.¹ OLIVA, J.⁴

¹ Centre de Ciència i Tecnologia Forestal de Catalunya. Ctra, Sant Llorenç de Morunys Km 2, E25280, Solsona, Spain.

² Swedish University of Agricultural Sciences, Department of Forest Mycology and Plant Pathology, SE, 75007, Uppsala, Sweden.

³ Universitat de Lleida, Av. Alcalde Rovira Roure 191, E25198, Lleida, Spain.

⁴ Joint Research Unit CTFC -AGROTECNIO-CERCA, Av. Alcalde Rovira Roure 191, E25198, Lleida, Spain.

Resumen

La trufa negra (*Tuber melanosporum* Vittad.) es de los pocos hongos micorrílicos que se ha conseguido cultivar. Una de las principales preocupaciones de los truficultores es que los hongos ectomicorrílicos (ECM) provenientes de terrenos aledaños al cultivo puedan desplazarla y perjudicar su producción futura. Para ello, es necesario conocer las comunidades de hongos ECM procedentes de los montes que rodean a las plantaciones, así como su evolución a lo largo de la vida de las plantaciones, para así determinar la viabilidad del cultivo en el tiempo. Con el objetivo de estudiar la influencia de la comunidad fúngica en las plantaciones de trufa negra, se analizó una plantación trufera en Lleida y también cómo evoluciona esta comunidad con la edad de las plantaciones (plantaciones de 3, 5, 7, 10, 14 y 20 años en Teruel). Los resultados obtenidos indican que los plantones inoculados con *T. melanosporum* en ambientes forestales pueden ser colonizados por otras especies ECM y que la comunidad fúngica varía a lo largo de la vida de las plantaciones. En nuestros experimentos, observamos que la biomasa de micelio de *T. melanosporum* no está afectada por la distancia al bosque o por la abundancia de otros hongos ECM distintos de *T. melanosporum*. Tampoco vemos que *T. melanosporum* disminuya a lo largo de 20 años. De hecho, nuestros resultados muestran que en plantación esta especie es capaz de mantener su nicho sin competencia de otros hongos.

Palabras clave

Truficultura, diversidad fúngica, cronosecuencia trufa negra, *Quercus ilex*.

1. Introducción

La trufa negra negra (*Tuber melanosporum* Vittad.) es un hongo hipogeo ectomicorrílico. Debido a su alto valor en el mercado, su cultivo está ampliamente extendido en todas las áreas de clima Mediterráneo alrededor del mundo (Europa, Australia, EUA, Chile, Argentina, Sudáfrica y Nueva Zelanda) (Cejka et al., 2022; Oliach et al., 2021). Las plantaciones se realizan con plantones micorrizados del género *Quercus* y *Corylus*, realizándose principalmente con *Q. coccifera*, *Q. faginea*, *Q. humilis*, *Q. ilex* y *C. avellana* (Fischer et al., 2017). A pesar de los grandes avances realizados en el conocimiento de la gestión de las plantaciones truferas, muchas plantaciones tienen todavía producciones inconsistentes en el tiempo y en el espacio (Leonardi et al., 2020; Selosse, 2020).

La competencia por otras especies del género *Tuber* de menor valor como *Tuber aestivum* Vittad., *Tuber brumale* Vittad. o *Tuber borchii* Vittad. o por otras especies de hongos ectomicorrílicos (ECM) se han apuntado como una de las posibles causas del fracaso de las plantaciones (De Miguel et al., 2014; García-Montero et al., 2008; Piñuela et al., 2021; Valverde-Asenjo et al., 2009). Por este motivo, la realización de plantaciones de trufa negra en parcelas colindantes al bosque o con la presencia cercana de especies huésped ectomicorrílicas, se han desaconsejado tradicionalmente, debido, en principio, a la abundancia potencial de esporas o de micelio de hongos ectomicorrílicos competidores que podrían desplazar a *T. melanosporum* (Frochot et al., 1990; Reyna, 2012; Sourzat, 1997). No obstante, es necesario comprender la ecología de *T. melanosporum* y las

interacciones con el resto de la comunidad fúngica para ver si esta premisa es cierta y para ello, todavía faltan estudios exhaustivos que describan cómo cambia la comunidad fúngica a lo largo de la vida de una plantación. De igual manera, tampoco existe información precisa sobre la posible competencia entre las especies nativas de hongos ECM y la especie introducida (*T. melanosporum*) en un entorno de plantación rodeado de bosque.

2. Objetivos

El primer objetivo del estudio fue analizar el efecto de la distancia del árbol huésped al bosque en el desarrollo de *T. melanosporum* en plantones plantados bajo condiciones de alta exposición a inóculo de otros hongos ECM. El segundo objetivo consistió en analizar los cambios en la composición de la comunidad fúngica en una cronosecuencia de 20 años en 29 plantaciones de *Tuber melanosporum* a los 3, 5, 7, 10, 14 y 20 años de su establecimiento.

3. Metodología

Para el primer objetivo, se estableció en mayo de 2010 una plantación de 249 *Quercus ilex* inoculadas con *T. melanosporum* en un pasto abandonado de una hectárea en el Prepirineo de Lleida (42°02'36.96"N, 1°14'5.62"E). La plantación está situada a 996 m.s.n.m y presenta un suelo calcáreo y una textura Franca (USDA), estando rodeada la parcela de un bosque de encinas adulto. Las plántulas se plantaron con un marco de plantación de 6 m x 6 m. En cada árbol se colocó un acolchado de polipropileno de 2 m x 2 m para evitar la competencia herbácea y favorecer su supervivencia durante los primeros años de la vida de la plantación (Olivera et al., 2014). Cinco años después de realizar la plantación (mayo de 2015), se escogieron al azar 28 árboles, y se midieron la altura, el diámetro del cuello y la distancia mínima al bosque. De cada uno de los 28 árboles, recogimos muestras de suelo a 40 y 80 cm del tronco (28 x 2 distancias = 56 muestras) para determinar la cantidad de micelio de *T. melanosporum* de cada árbol, relacionándolo con la distancia al monte y al mismo tiempo caracterizar la comunidad de hongos del suelo.

Para el segundo objetivo (cronosecuencia), el estudio se llevó a cabo en 29 plantaciones de un proyecto a largo plazo en curso para observar los patrones de crecimiento de *T. melanosporum* en árboles inoculados de *Quercus ilex* en la provincia de Teruel (Liu et al., 2016, 2014). Las edades estudiadas representaban la etapa de pre y postproducción según Suz et al. (2008): 3, 5 y 7 años, y 10, 14 y 20 años, respectivamente. Seleccionamos 5 plantaciones de cada edad, excepto a la edad de 5 años, en la que sólo se muestraron 4 plantaciones. En cada plantación se seleccionó un árbol al azar. De ese árbol se tomaron muestras de suelo a 40, 100 y 200 cm del tronco, para determinar la cantidad de micelio de *T. melanosporum* y caracterizar la comunidad de hongos del suelo.

La comunidad del suelo se estudió mediante la secuenciación masiva utilizando la región ITS2 (Ihrmark et al., 2012), y el micelio se cuantificó mediante la técnica qPCR (Parladé et al., 2013).

4. Resultados

En el primer estudio y cinco años después del establecimiento de las plántulas, la altura media de los árboles era de 74,6 cm (con un rango de 28 a 120 cm) con un diámetro medio del cuello de la raíz de 10,7 mm (con un rango de entre 5,55 y 24,20 mm). No se encontró ninguna relación entre el diámetro del cuello de la raíz o la altura de la planta con la distancia al bosque ($p=0,21$ y $p=0,98$ respectivamente). Como era de esperar dada la edad temprana de la plantación, el micelio de *T. melanosporum* se encontró principalmente cerca del tronco (40 cm) y rara vez se detectó a los 80 cm (una media de $0,601 \text{ mg-g}^{-1}$ a 40 cm frente a $0,016 \text{ mg-g}^{-1}$ de suelo a 80 cm, $p<0,0001$). La comunidad fúngica varió en función de la distancia del bosque ($p=0,002$) (Tabla 1), siendo los árboles plantados más cerca del bosque los que presentan una comunidad distinta. A 40 cm del tronco, dónde las comunidades fúngicas corresponden a la del árbol hospedante, se encontró que la proporción de hongos ECM distintos de *T. melanosporum* aumentaban con la

proximidad al bosque, pero no se encontró esta relación a los 80 cm del tronco. La comunidad fúngica del suelo también varió en función del diámetro del cuello de la raíz (Tabla 1). El efecto del diámetro del cuello de la raíz sobre la composición fúngica varió con la distancia al bosque (interacción significativa diámetro del cuello × distancia al bosque, Tabla 1). La interacción entre el diámetro del cuello de la raíz y la distancia reveló que mientras la distancia tenía una influencia en la comunidad que rodeaba a los árboles pequeños ($p=0,001$), no había diferencias para los árboles de mayor diámetro del cuello de la raíz ($p=0,29$). Además de la distancia al bosque, hubo diferencias en la composición fúngica del suelo entre las muestras realizadas a 40 cm y a 80 cm del tronco de los árboles (Tabla 1). Así a 40 cm, encontramos que la cantidad de micelio de *T. melanosporum* afectaba a la composición de la comunidad ($R^2=0,05$, $p=0,046$). Sin embargo, no se encontró ninguna asociación entre la composición y la cantidad de micelio de *T. melanosporum* a 80 cm ($p=0,22$) y tampoco se encontró ninguna relación entre la cantidad de micelio de *T. melanosporum* y la cantidad de hongos ECM distintos de *T. melanosporum* a 40 cm ($p=0,90$) ni a 80 cm del tronco ($p=0,64$).

Tabla 1. PERMANOVA de la comunidad fúngica transformada mediante Hellinger a nivel de especie en una plantación trufera. Factores principales (DT = distancia al tronco (cm); DF = distancia al bosque (m); D = diámetro del cuello de la raíz del árbol (mm)).

Factor	g.l.	R ²	p-valor
Distancia al tronco (DT)	1	3,5	0,005
Distancia al bosque (DF)	1	4,44	0,002
Diámetro del cuello de la raíz del árbol (D)	1	2,75	0,040
DT x DF	1	1,09	0,975
DT x D	1	1,23	0,896
DF x D	1	3,15	0,016
DT x DF x D	1	0,01	0,989
Total	55		

Los resultados del estudio de cronosecuencia mostraron que el micelio de *T. melanosporum* aumentaba su abundancia con la edad de los árboles y disminuía con la distancia al tronco del árbol huésped ($p<0,001$ y $p<0,001$ respectivamente). Observamos cambios en la composición fúngica de la comunidad con la edad de los árboles ($p=0,001$) y con la distancia al tronco ($p=0,002$). Los cambios en la composición fúngica reflejaron un incremento de la abundancia de *T. melanosporum* con la edad de la plantación: a 40 cm no había diferencias entre las edades ($R^2=0,20$, $p=0,134$), mientras que sí las hubo a 100 y 200 cm ($R^2=0,27$, $p=0,006$, y $R^2=0,33$, $p=0,001$, respectivamente). La abundancia relativa de los grupos funcionales fúngicos que no incluyen a *T. melanosporum* cambió a lo largo de la edad de la plantación (Tabla 2), y la mayoría de ellos disminuyeron su abundancia a medida que la plantación se desarrollaba. En cambio, los hongos ectomicorrícos distintos de *T. melanosporum* no mostraron ninguna asociación con la edad. Tampoco se encontró ninguna asociación entre la abundancia de *T. melanosporum* en el suelo basada en la qPCR y la abundancia relativa de hongos ECM. Por el contrario, la abundancia de *T. melanosporum* se correlacionó con una disminución de los hongos micorrícos arbusculares, los mohos, las levaduras y los hongos patógenos de plantas (Tabla 2), aunque algunas de estas asociaciones no fueron lineales. Por ejemplo, se observó un marcado descenso de los hongos patógenos vegetales a partir de los 10 años, observando que disminuyeron de forma significativa en las edades más maduras: 14 y 20 años (Tabla 2). El análisis de las especies indicadoras mostró que *T. melanosporum* se asoció con los árboles de 5, 7, 10, 14 y 20 años ($p=0,04$). En general, se encontró un número similar de OTUs ectomicorrícas en todas las edades. Encontramos que *Genabea* spp y *Melanogaster* spp resultaron ser especies indicadoras a los 40 cm a las edades de 5 y 10 años mientras que *Rhizopogon roseolus* se encontró asociado a 100 cm y 200 cm a los 10 años y *Trichophaea* spp a 200 cm a los 20 años. Respecto a otras especies del género *Tuber*, sólo identificamos a *T. brumale* de forma ocasional en tres muestras a 40 cm a las edades de 3, 7 y 14 años.

Tabla 2. Relación de la abundancia relativa de los grupos funcionales de hongos con la edad de los árboles huésped (3, 5, 7, 10, 14 y 20 años) y con la abundancia de micelio de *T. melanosporum*, incluyendo todas las distancias desde el tronco (40, 100 y 200 cm). Letras diferentes indican diferencias significativas entre las edades de la plantación ($P<0,05$). Se muestra la relación positiva (+) o negativa (-) y la significación (p : "ns" $\geq 0,05$).

Grupos funcionales de hongos	3 años (%±SE)	5 años (%±SE)	7 años (%±SE)	10 años (%±SE)	14 años (%±SE)	20 años (%±SE)	Abundancia de <i>T. melanosporum</i> y nivel significación
ECM, incluyendo <i>T. melanosporum</i> (%)	8,5±2,1 b	21,3±8,1 b	16,3±2,4 b	24,6±4,9 b	53,4±2,7 a	43,3±8,2 a	+ (0,000)
ECM, excluyendo <i>T. melanosporum</i> (%)	1,8±0,9 a	8,8±5,8 a	3,8±1,9 a	8,1±3,8 a	15±4,0 a	6,8±4,2 a	ns
<i>T. melanosporum</i> (%)	6,7±1,7 a	12,5± 4,7 a	12,5±4,3 a	16,5±5,0 a	38,4±4,4 b	36,4±5,9 b	-
Micorrizas arbusculares (%)	0,4±0,1 ab	1,1±0,5 ab	1,4±0,1 a	2,4±1,5 ab	0,4±0,1 ab	0,2±0,0 b	- (0,009)
Saprófito Ascomiceto (%)	13,9±2,3 ab	14,5±2,9 ab	15,0±1,7 ab	15,8±1,6 ab	9,0±1,1 b	19,5±4,6 a	ns
Mohos (%)	12,5±2,5 ab	14,4±2,4 a	15,8±2,1 a	12,7±1,6 a	6,6±1,5 c	7,7±0,2 cb	- (0,006)
Levaduras (%)	10,3±2,2 a	6,0±0,8 ab	8,2±1,9 a	8,8±0,7 a	7,6±0,8 ab	4,7±1,1 b	- (0,039)
Patógenos vegetales (%)	17,1±3,7 a	15,3±2,3 a	14,6±3,0 a	10,7±2,1 a	7,6±0,7 b	6,2±1,3 b	- (0,009)

5. Discusión

Los hongos ectomicorrícos (ECM) se han utilizado en ocasiones para mejorar el establecimiento y el crecimiento de las plantaciones forestales, pero también se pueden cultivar para obtener un rendimiento económico. Las trufas pertenecientes al género *Tuber* se encuentran entre los pocos y más exitosos intentos de cultivar hongos micorrícos comestibles (Guerin-Laguette, 2021). El cultivo de la trufa negra (*Tuber melanosporum* Vitt.) es uno de los más avanzados, aunque todavía no se ha logrado su completa domesticación (Selosse, 2020). Entre las recomendaciones más generalizadas para garantizar el éxito de la plantación, se ha desaconsejado tradicionalmente el establecimiento de plantaciones en zonas forestales (Sourzat, Genola & Saenz, 2010). El principal argumento ha sido que los hongos ECM de las parcelas forestales cercanas pueden desplazar con el tiempo a *T. melanosporum* en el sistema radicular de las plantas inoculadas introducidas en campo, poniendo en riesgo la viabilidad de la producción de trufas. No obstante, dado que *T. melanosporum* se introduce primero al inocularse la planta en vivero, podría tener una ventaja sobre los posibles competidores procedentes del bosque (Reyna, 2012), sin perjuicio que puedan establecerse otros hongos ECM. En nuestro caso, observamos que la composición de la comunidad fúngica del suelo bajo los árboles plantados más cerca del bosque era diferente de la comunidad bajo los árboles situados en el centro de la plantación. Vimos que la supuesta influencia de la distancia al borde del bosque en la comunidad de hongos del suelo era menor en el caso de los árboles de mayor diámetro del cuello de la raíz siendo estos también los árboles que presentaban la mayor cantidad de micelio de *T. melanosporum*. Los árboles pequeños parecían ser menos capaces de mantener a *T. melanosporum* y también eran más propensos a acoger la comunidad nativa del suelo. A pesar de la marcada diferencia entre las comunidades fúngicas alrededor del borde del bosque y en el centro de la plantación, *T. melanosporum* fue capaz de establecerse en toda la plantación (no se encontró ninguna correlación entre la abundancia de micelio de *T. melanosporum* y la distancia al bosque). También observamos que el crecimiento de los árboles parece ser un factor clave en el establecimiento de *T. melanosporum*. Nuestros resultados confirman los hallazgos obtenidos anteriormente en otros estudios (Suz et al., 2008), que muestran que una mayor abundancia de micelio se encuentra bajo los árboles de mayor diámetro del cuello de la raíz.

En el caso de la cronosecuencia de 20 años, observamos un incremento lineal de la abundancia de *T. melanosporum* paralelo a la edad de los árboles huésped, desarrollándose de forma constante tanto a escala temporal como espacial. A medida que la trufa negra se desarrollaba, dominaba la comunidad fúngica y alcanzaba su máximo bajo árboles de 10 años, sin que se encontraran grandes diferencias entre estos árboles y los de mayor edad (14 y 20 años). No encontramos signos de competencia o sustitución con otros grupos funcionales, ya que i) no encontramos incrementos en otros ECM que no fueran *T. melanosporum* con la edad, y ii) no se encontraron OTUs de ECM claramente indicadores en los árboles más adultos. Así, veinte años después del establecimiento, *T. melanosporum* seguía siendo abundante en las proximidades del tronco, es decir, en las zonas que fueron colonizadas justo después de la plantación. Estudios previos han sugerido que otras especies ECM pueden desplazar de forma progresiva a *T. melanosporum* con la edad del árbol (Águeda et al., 2010; Olivier et al., 2018). En nuestro caso, la proporción de hongos ECM distintos de *T. melanosporum* se mantuvo constante a lo largo del tiempo, coincidiendo con los resultados obtenidos en estudios previos donde no se observa un desplazamiento de *T. melanosporum* por otros hongos ECM (Liu et al., 2014, 2016), por lo que podemos rechazar la hipótesis de que otros hongos ECM desplazarían a *T. melanosporum* con la edad del árbol.

6. Conclusiones

Los resultados obtenidos del primer objetivo tienen implicaciones en la gestión forestal. La conversión de pastos abandonados o antiguos campos agrícolas en plantaciones truferas puede ser

una estrategia para recuperar los mosaicos paisajísticos característicos del bosque mediterráneo. Además, puede suponer una vía para la recuperación de la producción silvestre y que podría ayudar a capitalizar las explotaciones forestales con los ingresos obtenidos. Nuestros resultados indican que, aunque la vecindad del bosque influya en la comunidad fúngica del suelo, ésta puede tener un efecto limitado en el crecimiento del micelio de la trufa de una encina (*Q. ilex*) de 5 años. Destaca el papel del crecimiento del árbol, el cual condiciona la mayor abundancia de micelio de *T. melanosporum*, lo que nos sugiere mejorar las prácticas de gestión para promover el crecimiento de la planta.

Además, hemos podido confirmar que la expansión de *T. melanosporum* sigue el desarrollo del sistema radicular, desplazando a los otros grupos funcionales, no encontrando signos de que *T. melanosporum* sea reemplazada por otros hongos ECM. Y que la producción de *T. melanosporum* no está limitada por la competencia por otros hongos ECM distintos, por lo que sería necesario investigar otros mecanismos adicionales que subyacen en la producción de la trufa negra.

7. Agradecimientos

Este trabajo tuvo el apoyo por parte del “Departament d’Acció Climàtica, Alimentació i Agenda Rural de la Generalitat de Catalunya” y por el Ministerio de Ciencia, Innovación y Universidades del Gobierno de España (RTI2018-099315-A-I00). J. Oliva fue beneficiario de una beca "Ramón y Cajal" (RYC-2015-17459).

8. Bibliografía

ÁGUEDA, B.; FERNÁNDEZ-TOIRÁN, L.M.; DE MIGUEL, A.M.; MARTÍNEZ-PEÑA, F.; 2010. Ectomycorrhizal status of a mature productive black truffle plantation | Comunidad de ectomicorras en una plantación adulta productora de trufa negra. Investig. Agrar. Sist. y Recur. For. 19, 89–97.

CEJKA, T.; ISAAC, E.; OLIACH, D.; MARTINEZ-PENA, F.; EGLI, S.; THOMAS, P.; TRNKA, M.; BÜNTGEN, U.; 2022. Risk and reward of the global truffle sector under predicted climate change. Environmental Research Letters.

DE MIGUEL, A.M.; ÁGUEDA, B.; SÁNCHEZ, S.; PARLADÉ, J.; 2014. Ectomycorrhizal fungus diversity and community structure with natural and cultivated truffle hosts: applying lessons learned to future truffle culture. Mycorrhiza 24 Suppl 1, S5-18.

FISCHER, C.; OLIACH, D.; BONET, J.A.; COLINAS, C.; 2017. Best Practices for Cultivation of Truffles. Forest Sciences Centre of Catalonia (CTFC), Solsona, Spain; Yaşama Dair Vakıf, Antalya, Turkey.

FROCHOT, H.; CHEVALIER, G.; BARDET, M.C.; AUBIN, J.P.; 1990. Effet de la désinfection du sol et des antécédents culturaux sur l'évolution de la mycorhization avec *Tuber melanosporum* sur noisetier, En: M. Bencivenga, M.G. (Eds.). Atti Del II Congresso Internazionale Sul Tartufo, Italy (1990), pp. 289-296.

GARCÍA-MONTERO, L.G.; DÍAZ, P.; MARTÍN-FERNÁNDEZ, S.; CASERMEIRO, M.A.; 2008. Soil factors that favour the production of *Tuber melanosporum* carpophores over other truffle species: a multivariate statistical approach. Acta Agriculturae Scandinavica, Section B - Plant Soil Science 58, 322–329.

GUERIN-LAGUETTE, A.; 2021. Successes and challenges in the sustainable cultivation of edible mycorrhizal fungi – furthering the dream. *Mycoscience* 62, 10–28.

IHRMARK, K.; BÖDEKER, I.T.M.; CRUZ-MARTINEZ, K.; FRIBERG, H.; KUBARTOVA, A.; SCHENCK, J.; STRID, Y.; STENLID, J.; BRANDSTRÖM-DURLING, M.; CLEMMENSEN, K.E.; LINDAHL, B.D.; 2012. New primers to amplify the fungal ITS2 region-evaluation by 454-sequencing of artificial and natural communities. *FEMS Microbiol. Ecol.* 82, 666–677.

LEONARDI, P.; MURAT, C.; PULIGA, F.; IOTTI, M.; ZAMBONELLI, A.; 2020. Ascomycete genotyping and mating type analyses of mycorrhizas and soil mycelia of *Tuber borchii* in a truffle orchard established by mycelial inoculated plants. *Environmental Microbiology* 22, 964–975.

LIU, B.; FISCHER, C.; BONET, J.A.; OLIVERA, A.; Inchusta, A.; COLINAS, C.; 2014. Pattern of *Tuber melanosporum* extramatrical mycelium expansion over a 20-year chronosequence in *Quercus ilex*-truffle orchards. *Mycorrhiza* 24 Suppl 1, S47–54.

LIU, B.; FISCHER, C.R.; BONET, J.-A.; CASTAÑO, C.; COLINAS, C.; 2016. Shifts in soil fungal communities in *Tuber melanosporum* plantations over a 20-year transition from agriculture fields to oak woodlands. *Forest Systems* 25.

OLIACH, D.; VIDALE, E.; BRENKO, A.; MAROIS, O.; ANDRIGHETTO, N.; STARA, K.; ARAGÓN, J.M. DE, COLINAS, C.; BONET, J.A.; 2021. Truffle Market Evolution: An Application of the Delphi Method. *Forests* 12, 1174.

OLIVERA, A.; BONET, J.A.; PALACIO, L.; LIU, B.; COLINAS, C.; 2014. Weed control modifies *Tuber melanosporum* mycelial expansion in young oak plantations. *Annals of Forest Science* 71, 495–504.

OLIVIER, J.; SAVIGNAC, J.; SOURZAT, P.; 2018. Truffe et trufficulture, Fanlac. Aubas Montingac Lascaux, France.

PARLADÉ, J.; DE LA VARGA, H.; DE MIGUEL, A.M.; SÁEZ, R.; PERA, J.; 2013. Quantification of extraradical mycelium of *Tuber melanosporum* in soils from truffle orchards in northern Spain. *Mycorrhiza* 23, 99–106.

PIÑUELA, Y.; ALDAY, J.G.; OLIACH, D.; CASTAÑO, C.; BOLAÑO, F.; COLINAS, C.; BONET, J.A.; 2021. White mulch and irrigation increase black truffle soil mycelium when competing with summer truffle in young truffle orchards. *Mycorrhiza* 31, 371–382.

REYNA, S.; 2012. Truficultura Fundamentos y técnicas, 2nd ed. Mundi-Prensa.; Madrid.
SELOSSE, M.-A.; 2020. Truffles. *Current Biology* 30, R382–R383.

SOURZAT P, GENOLA L, SAENZ W, B.-R.E.; 2010. L'environnement truffier: contraintes et gestion. Station d'Expérimentation sur la Truffe, Le Montat, France.

SOURZAT, P.; 1997. Guide pratique de trufficulture. Station d'Expérimentations sur la Truffe, Le Montat, France.

SUZ, L.M.; MARTÍN, M.P.; OLIACH, D.; FISCHER, C.R.; COLINAS, C.; 2008. Mycelial abundance and other factors related to truffle productivity in *Tuber melanosporum*-*Quercus ilex* orchards. FEMS Microbiology Letters 285, 72–8.

VALVERDE-ASENJO, I.; GARCÍA-MONTERO, L.G.; QUINTANA, A.; VELÁZQUEZ, J.; 2009. Calcareous amendments to soils to eradicate *Tuber brumale* from *T. melanosporum* cultivations: a multivariate statistical approach. Mycorrhiza 19, 159–65.